

DESENHO DE MOLÉCULAS SINTÉTICAS DE DNA

EDUARDO BIERHALS BLÖDORN¹; WILLIAM BORGES DOMINGUES²;
LEANDRO SILVA NUNES²; AMANDA WEEGE DA SILVEIRA MARTINS²;
EDUARDO NUNES DELLAGOSTIN²; VINÍCIUS FARIAS CAMPOS³

¹Universidade Federal de Pelotas – edu.bbloodorn@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – williamwwe@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – leandro_donfa@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – amandaweege98@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – edu.ndell@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Em março desse ano, o FDA (*Food and Drug Administration*), órgão que regula a liberação de alimentos e medicamentos no mercado americano, acabou com mais uma barreira para entrada do salmão transgênico nos EUA. O salmão transgênico, produto da empresa de biotecnologia AquaBounty Technologies, já havia sido liberado anteriormente pelo mesmo órgão americano em 2015, mas sofreu com retaliações de produtores do salmão selvagem, que exigiam a obrigatoriedade de rotulações específicas no salmão GM. Embora já tivesse sido liberado no Canadá, o salmão transgênico passou, desde 1995, por um longo período de avaliação no FDA. Por fim, as autoridades sanitárias concluíram que a transgênese não alteraria as características nutricionais do produto, sendo assim, seguro o suficiente para o consumo humano. Agora, com a liberação em um dos principais mercados mundiais, não só cresce a expectativa de que o salmão transgênico alcance outros mercados importantes, mas também que essa liberação possa abrir portas para que mais peixes transgênicos apareçam no mercado (WALTZ, 2016; BLOCH, 2019).

O primeiro programa nacional de melhoramento genético de salmão (*Salmo salar*) começou em 1970, na Noruega. Ainda, outros programas surgiram, em países como EUA e Canadá, e características como maior crescimento e melhor conversão alimentar têm sido selecionadas na espécie desde então (DA SILVA et al. 2018). Mesmo assim, o salmão modificado (também *Salmo salar*), que recebeu o gene do hormônio do crescimento de outra espécie de salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*) e um promotor de enguia (*Zoarces americanus*), agora cresce duas vezes mais rápido do que seus pares não modificados, atingindo o peso comercial em 18 meses, com menor consumo de ração. Assim, através da transgênese, inúmeras características podem ser conferidas aos animais, que dificilmente as conseguiriam por outros meios. No caso dos peixes, essa opção é ainda mais atrativa, uma vez que as construções “*all-fish*” costumam ter resultados positivos na maioria das espécies (ZBIKOWSKA, 2003), e os métodos de contenção utilizados, como a produção de peixes “em terra”, em tanques, também acabam por ser vantajosos (DAVIDSON et al., 2016).

No Brasil, a tilápia (*Oreochromis niloticus*) representa pelo menos 51% da piscicultura nacional. Com 400 mil toneladas produzidas em 2018, o país ocupa a quarta posição mundial entre os países que mais produzem tilápias, somente atrás da China, Indonésia e Egito (PEIXE BR). De fato, a espécie apresenta muitas características favoráveis à piscicultura, como rusticidade, facilidade na obtenção de larvas, elevada taxa de crescimento em diversos sistemas de produção, hábito alimentar onívoro, boa conversão alimentar, capacidade de

reprodução em cativeiro e aceitação do mercado consumidor. Ainda, diversos programas de melhoramento genético utilizaram a espécie, como o projeto GIFT (*Genetic Improvement of Farmed Tilapias*) que iniciou em 1988 nas Filipinas, e o projeto iniciado pela Universidade Estadual de Maringá, no Paraná, em 2005, que tinha como objetivo aumentar o crescimento e a conversão alimentar das tilápias GIFT (DA SILVA et al., 2018).

Contudo, o cultivo de tilápias em regiões de clima temperado e subtropical ainda se mostra um desafio, uma vez que a espécie é exótica, de clima tropical, e possui temperatura de conforto térmico entre de 25 e 28°C, sendo altamente sensível as baixas temperaturas. O manuseio e o transporte sob baixas temperaturas (<22°C), principalmente após o inverno, levam à redução drástica do apetite e aumentam os riscos de doenças. Ainda, o cultivo destes peixes à uma temperatura abaixo de 14°C geralmente é letal (BARCELOS, FAGUNDES, 2012). Em vista do exposto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver composições sintéticas de DNA recombinante para o processo de transgênese e obtenção de peixes, mais especificamente tilápias, tolerantes ao frio.

2. METODOLOGIA

Sequências de DNA de genes de interesse foram obtidas em formato FASTA a partir do banco GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequências de promotores gênicos de interesse foram encontradas no mesmo banco e em artigos relacionados. Os genes tiveram suas sequências de códons otimizadas para espécie alvo, *Oreochromis niloticus*, nas ferramentas Codon Harmonizer (<http://biocatalysis.uni-graz.at/sites/codonharmonizer.html>) e Codon Optimization Tool (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>). As identidades das sequências otimizadas foram avaliadas através da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Logo após, (1) para evitar erros nas sequências das proteínas codificadas e (2) identificar domínios funcionais que não poderiam ser alterados, foram utilizadas as ferramentas BLAST e Uniprot (<https://www.uniprot.org/>).

Para cada sequência proteica de interesse, pelo menos cinco outras sequências de proteínas ortólogas de espécies relacionadas foram obtidas. Em seguida, realizou-se o alinhamento múltiplo de sequências com a ferramenta ClustalW (<https://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>). O alinhamento foi baixado e visualizado no programa Ugene (Ugene.net), que foi utilizado para modificar a sequência da proteína. Para modificação da estrutura da proteína, também foi realizada a análise *in silico* da tolerância do sítio a substituição com os softwares SIFT (https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html) e PROVEAN (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php).

Para a construção das moléculas sintéticas de DNA recombinante, o programa VectorNTI (Invitrogen, USA) foi utilizado. Durante a construção, as sequências codificantes (CDS) foram adicionadas logo após a porção 3' da sequência promotora. Entre as sequências promotora e CDS, foi adicionada uma sequência de Kozak, sequência capaz de aumentar a expressão gênica. Ao lado da região 3' do códon de terminação da sequência codificadora foi incluída uma sequência de um sítio de poliadenilação (do inglês, PolyA site). Ainda, sequências para enzimas de restrição compatíveis foram adicionadas nos flancos da sequência. Após finalizadas, as sequências foram testadas novamente nos bancos de dados de DNA e proteínas, e no site PatSeq Finder (<https://www.lens.org/lens/bio/patseqfinder>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos métodos descritos, duas sequências sintéticas de DNA recombinante, com 3109 e 3115 pares de bases, puderam ser desenhadas. Todos os testes *in silico* indicam que as moléculas são completamente funcionais: as proteínas expressas mantêm seus sítios funcionais e enovelamento característico. De acordo com a busca no PatSeq Finder, as sequências também não possuem anterioridade no banco de sequências depositadas em outras patentes. Posteriormente, testes *in vivo* poderão testar a eficiência das sequências desenhadas.

4. CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que duas sequências sintéticas de DNA recombinante foram eficientemente desenvolvidas para obtenção de tilápias tolerantes a baixas temperaturas através de métodos de transgênese. Embora as sequências ainda não tenham sido testadas *in vivo*, o processo de depósito de uma patente de invenção referente as sequências já foi iniciado via SEI.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCELLOS, Leonardo José Gil; FAGUNDES, M. Policultivo de jundiás, tilápias e carpas. Uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense (2ª Ed.). Passo Fundo: **Editora da Universidade de Passo Fundo**, 2012. 318 p.

BLOCH, Sam. **AquAdvantage, the first GMO salmon, is coming to America.** The New Food Economy. 11 março 2019. Acessado em 13 setembro 2019. Disponível em: < <https://newfoodeconomy.org/fda-aquabouty-gmo-salmon-seafood-restriction-market/> >

DAVIDSON, John et al. Production of market-size North American strain Atlantic salmon *Salmo salar* in a land-based recirculation aquaculture system using freshwater. **Aquacultural engineering**, v. 74, p. 1-16, 2016.

DA SILVA, G. F. et al. Programas de melhoramento genético na piscicultura. Palmas, TO. **Embrapa Pesca e Aquicultura-Documents (INFOTECA-E)**, 2018.

PEIXE BR. **Piscicultura brasileira produziu 722.560 toneladas em 2018, segundo levantamento da Peixe BR.** 22 fevereiro 2019. Acessado em 13 setembro 2019. Disponível em: < <https://www.peixebr.com.br/piscicultura-brasileira-produziu-722-560-toneladas-em-2018-segundo-levantamento-da-peixe-br/> >

WALTZ, Emily. GM salmon declared fit for dinner plates. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 7-9, 2016.

ZBIKOWSKA, Halina M. Fish can be first—advances in fish transgenesis for commercial applications. **Transgenic Research**, v. 12, n. 4, p. 379-389, 2003.